



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0035985

(43) 공개일자

2013년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/405 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

C07K 17/14 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0109601

(22) 출원일자

2012년10월02일

심사청구일자

2012년10월02일

(30) 우선권주장

1020110100176 2011년09월30일 대한민국(KR)

1020110100177 2011년09월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

백승필

대전광역시 유성구 하기동 송림마을아파트

602-1604

기미란

충청남도 연기군 조치원읍 침산리 옥일아파트

113-701

(74) 대리인

특허법인다나

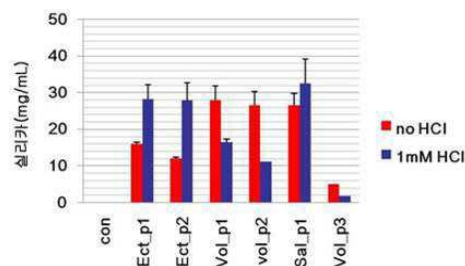
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 실리카 합성 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 실리카 합성 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상온, 상압, 중성 부근의 약염기 조건의 수용액 하에서 실리카 전구체로부터 실리카를 중합할 수 있는 실리카 합성 펩타이드를 제공한다. 상기 실리카 합성 펩타이드는 실리카 합성 시 자기조립 구조체를 형성할 수 있어 실리카 기반의 단백질 고정화, 바이오 센서, 약물전달체 등 다양한 바이오소재로 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D11014110H320000190

부처명 국토해양부

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양유래 바이오실리카기반 약물전달용 신복합소재개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.12.01 ~ 2011.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 실리카 합성용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

실리카 전구체를 더 포함하는 실리카 합성용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 에틸 트리에톡시실란, 티타니아 테트라이소프로폭사이드 및 테트라에틸 게르마늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 실리카 합성용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

효소 또는 결합 펩타이드를 포함하고, 상기 결합 펩타이드는 항체, DNA 또는 RNA와 특이적으로 결합하는 펩타이드, 또는 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 실리카 합성용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

자기조립이 가능한 단백질, 나노 튜브 또는 나노메시 (nanomesh)를 더 포함하는 실리카 합성용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

자기조립이 가능한 단백질은 페리틴 (ferritin) 또는 바이러스 캡시드 단백질인 실리카 합성용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

인지질을 더 포함하는 실리카 합성용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

하이드록시아파타이트를 더 포함하는 실리카 합성용 조성물.

청구항 9

서열번호 1 내지 10에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드; 및 자기조립이 가능한 단백질을 포함하는 융합 단백질.

청구항 10

제9항의 융합 단백질을 포함하는 실리카 합성용 조성물.

청구항 11

서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 또는 제9항의 융합 단백질과 실리카 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 실리카 합성방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

반응은 상온 및 상압의 조건에서 pH 6 에서 8의 수용액 하에서 실시하는 실리카 합성방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

반응은 효소 또는 결합 펩타이드를 더 포함하여 실시하고, 상기 결합 펩타이드는 항체, DNA 또는 RNA와 특이적으로 결합하는 펩타이드, 또는 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 실리카의 합성방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

반응은 나노 튜브 또는 나노메시 (nanomesh)를 더 포함하여 실시하는 실리카의 합성방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

반응은 인지질을 더 포함하여 실시하는 실리카의 합성방법.

청구항 16

제11항 또는 제15항에 있어서,

반응은 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드, 실리카 전구체 및 인지질을 반응시켜 실리카 단일막을 제조하는 것이거나, 상기 펩타이드, 실리카 전구체 및 인지질을 반응시켜 유기 복합체를 제조한 후, 열 또는 유기용매를 처리하여 유기물을 제거하여 다공성 실리카를 합

성하는 것인 실리카의 합성방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

반응은 하이드록시아파타이트를 더 포함하여 실시하는 실리카의 합성방법.

청구항 18

서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체.

청구항 19

제18항에 있어서,

Dylight 488 NHE-ester dye, Vybrant™ DiI, Vybrant™ DiO, 양자점(quantum dots) 나노입자, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, ICG(indocyanine green), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, 로다민 800, 란탄나이드 및 텍사스 레드로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 형광물질이 추가로 결합되어 있는 실리카 복합체.

청구항 20

제18항에 있어서,

항원, 항체, RNA, DNA, 합텐(hapten), 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴(lectin), 셀렉틴(selectin), 방사선 동위원소 표지성분 및 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 조직 특이적 결합성분이 추가로 결합되어 있는 실리카 복합체.

청구항 21

제18항에 있어서,

siRNA, 안티센스, 항암제, 항생제, 호르몬, 호르몬길항제, 인터루킨, 인터페론, 성장 인자, 종양 괴사 인자, 엔도톡신, 림포독시, 유로키나제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 프로테아제 저해제, 알킬포스포콜린, 방사선 동위원소로 표지된 성분, 심혈관계 약물, 위장관계 약물 및 신경계 약물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 약제학적 활성성분이 추가로 결합되어 있는 실리카 복합체.

청구항 22

제18항에 있어서,

효소 또는 결합 펩타이드가 추가로 결합되어 있고, 상기 결합 펩타이드는 항체, DNA 또는 RNA와 특이적으로 결합하는 펩타이드, 또는 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 실리카 복합체.

청구항 23

제18항에 있어서,

나노 튜브 또는 나노메시 (nanomesh)가 추가로 결합되어 있는 실리카 복합체.

청구항 24

제18항에 있어서,
인지질이 추가로 결합되어 있는 실리카 복합체.

청구항 25

제18항에 있어서,
하이드록시아파타이트가 추가로 결합되어 있는 실리카 복합체.

청구항 26

서열번호 1 내지 10에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 및 자기조립이 가능한 단백질의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체.

청구항 27

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체; 및
약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약물전달체.

청구항 28

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체; 및
약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조영제 조성물.

청구항 29

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체; 및
약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물.

청구항 30

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체; 및
약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물.

청구항 31

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체; 및
진단 프로브를 포함하는 다중 진단 프로브.

청구항 32

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체가 전기방사된 섬유.

청구항 33

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체가 전기방사된 섬유를 포함하는 필터.

청구항 34

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체를 포함하는 골대체제.

청구항 35

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체를 포함하는 포토닉스 소자.

청구항 36

제18항 또는 제26항의 실리카 복합체를 포함하는 바이오분자 검출용 바이오센서.

청구항 37

제36항에 있어서,

바이오분자는 핵산, 단백질, 다당류 또는 병원균인 바이오분자 검출용 바이오센서.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 상온, 상압, 중성 부근의 약염기 조건의 수용액 하에서 실리카 전구체로부터 실리카를 중합할 수 있는 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 산업화 이후 한정된 육상 가용자원의 소비 급증으로 인한 육상 자원 소재의 고갈로 인한 새로운 유용자원 개발이 국가적 미래를 위한 중요 이슈가 되고 있다. 따라서 미국, 유럽, 일본 등의 선진국들은 신규 원천 소재 개발 및 확보에 국가 역량을 집중시키고 있다. 여기에 더하여 환경오염으로 인한 지구 온난화 및 기후 변화 등은 인류의 생존을 위협하는 요인으로 작용하고 있어 경제성장과 환경보호를 동시에 추구하는 새로운 패러다임이 대두되고 있다.

[0003] 해양 자원을 이용하여 환경 친화적인 생물학적 생산방법을 통해 신소재를 생산하는 방법은 원천 기술의 확보뿐 아니라 친환경 산업으로 인한 국가적인 저탄소 녹색성장의 견인차 구실을 할 기술로 기대된다. 실리카는 특정 화학종들과 공유 결합이 가능하기 때문에 새로운 하이브리드 소재 (유기-무기 복합체) 합성에 중요하고, 또한 생체 적합한 소재로서 각 개별 소재의 단점을 보완할 수 있는 우수한 특성이 있다. 현재 실리카의 공업적 생산 공정은 고온, 강산 또는 강염기 조건이 요구되고 환경적으로 유해한 부산물 생성의 문제점이 있다.

[0004] 그러나 해양 생명체인 스펀지와 규조류의 추출물 또는 유전학적 정보를 바탕으로 실리카를 생합성 하는 효소 및 펩타이드가 발견됨으로써 이들에 의해 생산된 환경 친화적 바이오실리카 및 이의 다양한 용도로의 응용성으로

인해 전 세계적으로 해양 유래 바이오 실리카 복합 소재 개발이 이슈화되고 있다(Cha *et al.*, 2000, *Nature* 403:pp.289-292; Kroger *et al.*, 1999, *Science* 286: pp.1129-1132; Poulsen & Kroger, 2004, *J Biol Chem* 279: pp.42993-42999; Shimizu *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: pp.6234-6238). 바이오실리카 소재는, 다양한 용도에 적합한 제형화가 가능하고, 에너지효율성, 기계적·화학적 물성, 생체적합성, 대량생산성이 뛰어나므로 기대됨으로 바이오실리카 소재 확보를 위한 원천 기술의 보유는 매우 중요하다.

[0005] 규조류가 생산하는 실라핀은 260개의 아미노산 잔기를 가지며 이들이 성숙과정에서 7종류의 반복 서열을 갖는 펩타이드로 분해되고 각 펩타이드는 실리카 합성을 위한 주형 및 촉매제로 작용한다. 스펀지가 생산하는 실리카 합성 효소인 실리카테인의 경우는 스펀지 중간 아미노산 서열의 보존성이 매우 높은 반면 규조류가 생산하는 실리카 합성 펩타이드들은 아미노산 서열간의 보존성은 낮으나 단백질 합성 후 변형(post-translational modification)에 의해 구조적 유사성을 갖게 된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 미국 등록특허 제7,335,717호, 2008.02.26
(특허문헌 0002) 2. 미국 공개특허 제2004-0039179호, 2004.02.26
(특허문헌 0003) 3. 미국 공개특허 제2006-0153791호, 2006.07.13
(특허문헌 0004) 4. 유럽 공개특허 제1 504 037호, 2005.02.09
(특허문헌 0005) 5. 미국 공개특허 제2004-0028694호, 2004.02.12

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Cha JN, Stucky GD, Morse DE, Deming TJ (2000) Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides. *Nature* 403:289-292
(비특허문헌 0002) 2. Kroger N, Deutzmann R, Sumper M (1999) Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* 286:1129-1132
(비특허문헌 0003) 3. Luckarift HR, Spain JC, Naik RR, Stone MO (2004) Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat Biotechnol* 22:211-213
(비특허문헌 0004) 4. Marner WD, Shaikh AS, Muller SJ, Keasling JD (2009) Enzyme immobilization via silaffin-mediated autoencapsulation in a biosilica support. *Biotechnol Prog* 25:417-423
(비특허문헌 0005) 5. Poulsen N, Kroger N (2004) Silica morphogenesis by alternative processing of silaffins in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J Biol Chem* 279: 42993-42999
(비특허문헌 0006) 6. Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE (1998) Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6234-6238
(비특허문헌 0007) 7. Theil EC. (1987) Ferritin: structure, gene regulation, cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem.* 56:289-315
(비특허문헌 0008) 8. Li M, Viravaidya C, Mann S.(2007) Polymer-mediated synthesis of ferritin-encapsulated inorganic nanoparticles. *Small.* 3(9):1477-81

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 실리카를 합성할 수 있는 펩타이드 및 이를 이용하여 다기능성 실리카를 제조하는 용도를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드에 의해 제조된 실리카 기반 복합체의 전자, 화학, 약학 등의 다양한 산업 분야에서의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 실리카 합성용 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 실리카 합성용 조성물은 추가로, 실리카 전구체, 효소 또는 결합 펩타이드, 자기조립이 가능한 단백질, 나노튜브 또는 나노메시 등의 미세 구조, 인지질, 하이드록시아파타이트 등을 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 10에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드; 및 자기조립이 가능한 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 융합 단백질을 포함하는 실리카 합성용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 또는 상기 융합 단백질과 실리카 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 실리카 합성방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체를 제공한다.

[0016] 상기 실리카 복합체는 추가로, 형광물질, 조직 특이적 결합성분, 약제학적 활성성분, 효소 또는 결합 펩타이드, 나노튜브 또는 나노메시 등의 미세 구조, 인지질, 또는 하이드록시아파타이트 등이 결합되어 있을 수 있다.

[0017] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 10에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 및 자기조립이 가능한 단백질의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체를 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조영제 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체가 전기방사된 섬유를 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체가 전기방사된 섬유를 포함하는 필터를 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체를 포함하는 골대체제를 포함한다.

[0025] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체를 포함하는 포토닉스 소자를 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체를 포함하는 바이오분자 검출용 바이오센서를 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 새로운 바이오 실리카 소재로서 해양종 유래의 실리카 합성 펩타이드를 제공하는 효과가 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 실리카 합성 펩타이드를 이용하여 상온, 상압의 조건에서 약염기의 수용액 하에서 다기능성 실리카를 합성할 수 있어 환경적으로 유해한 부산물의 생성에 따른 종래기술의 문제점을 해소할 수 있다.

[0029] 본 발명의 실리카 합성 펩타이드는 실리카 합성 시 자기조립 구조체를 형성할 수 있어 상기 자기조립 구조체의 표면을 실리카가 둘러싸는 구조를 형성할 수 있다. 이러한 구조는 금속이온, 동위원소, 약물 등의 운반체로서의 역할과, 실리카 코팅 시 적절한 유기기 성분들을 섞어 용해성과 다공성을 조절할 수 있다.

[0030] 또한, 상기 실리카 기반 복합체는 효소, 기능성 리간드, 약물 등을 결합시켜 표적지향형 영상 진단, 치료, 바이오분자 검출, 약물 전달 등에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 해양종 유래의 실리카 합성 펩타이드, 즉, R5, GS 및 RG 펩타이드에 의한 실리카 합성 결과를 도시한 것으로, R5 및 RG 튜브에 보이는 흰색 침전물이 실리카 합성체이다.

도 2는 본 발명의 해양종 유래의 실리카 합성 펩타이드, 즉, R5, GS 및 RG 펩타이드에 의한 실리카 합성 결과를 정량화한 것이다.

도 3은 본 발명의 해양종 유래의 실리카 합성 펩타이드 RG 유래의 펩타이드 종류별 실리카 합성 결과를 정량화한 것이다.

도 4는 본 발명의 펩타이드, EctP1, SalP1과 VolP2에 의해 형성된 실리카 침전물의 형태를 보여주는 주사전자현미경 사진도로, (A)는 EctP1에 의해 pH7에서 합성된 실리카 모습, (B)는 SalP1에 의해 pH7에서 합성된 실리카 모습이고, (C)는 VolP2에 의해 합성된 실리카 모습이며, 표시된 스케일 바 (Scale bar)의 크기는 1 μ m이다.

도 5는 본 발명의 펩타이드들에 녹색형광단백질이 융합된 형태의 단백질생산을 위한 벡터 지도 (A)이며 이에 의해 생산된 단백질의 SDS-PAGE 전기영동 결과 (B)와 단백질에 의한 실리카 형성반응의 형광현미경 사진이다 (C). 스케일 바 (Scale Bar)의 크기는 500 μ m이다.

도 6은 본 발명의 펩타이드 (SalP1)에 녹색형광단백질이 융합된 형태의 단백질에 의해 합성된 실리카 구조체의 주사현미경 사진으로 (A)는 단백질이나 펩타이드 없이 비특이적으로 형성된 실리카 이고, (B)는 녹색형광단백질만 존재 시 형성된 실리카이고, (C)는 펩타이드 SalP1과 녹색형광단백질이 유전공학적으로 융합된 단백질에 의해 형성된 실리카 구조체이다.

도 7은 에너지 분산 엑스레이 분광기 (EDX) 측정을 통한 실리카 구조체 성분 분석 그림으로, 비특이적으로 침전되는 실리카 부분 (A)과 GFP-SalP1에 의해 합성된 실리카 구조체 부분 (B)의 분산 엑스레이 분광 분석 비교 결과이다.

도 8은 본 발명의 헬리코박터 파일로리(*H.pylori*) pfr 구조 및 해독 서열을 나타낸 것이다.

도 9는 페리틴 생산 벡터 구조 및 생산 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 R5-페리틴 합성 벡터 제조 및 생산 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 11은 His-tag이 없는 페리틴 (Pfr) 발현 벡터 및 그의 생산 단백질 서열을 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 융합 단백질들의 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 융합 단백질들의 실리카 합성 활성을 나타낸 것으로, a)는 펩타이드 단독에 의한 실리카 침전 활성이고, b)는 발현 단백질 양으로 정규화(normalization)한 실리카 침전비율이다.

도 14는 본 발명의 EctP2-페리틴 합성 벡터(A)이며 EctP2-페리틴 융합 단백질에 의해 합성된 실리카의 광학현미경 사진도(B)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0033] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0034] 용어, "실리카 합성 펩타이드" 또는 "실리카 합성 활성이 있는 펩타이드"는 실리카 전구체와 반응하여 실리카를 합성할 수 있는 펩타이드를 총칭한다.
- [0035] 용어, "자기조립이 가능한 단백질"이란 하나 이상의 단량체가 결합되어 내부 공간이 비어있는 코어-셸 형태의 구형의 거대분자를 형성하는 단백질을 의미한다.
- [0036] 용어, "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0037] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0038] 본 발명자들은 다양한 해양종으로부터 실리카를 합성할 수 있는 다양한 아미노산서열이 존재할 것으로 가정하고 post-translation modification에 중요한 하이드록시기(-OH)와 아민기(-NH₂)를 잔기로 갖는 아미노산인 세린, 라이신, 아르기닌, 히스티딘 등의 비율이 높은 아미노산 서열을 나타내는 펩타이드를 쿼리로 사용하여 미국 NCBI의 단백질 데이터 베이스로부터 새로운 실리카 합성 펩타이드를 탐색함으로써 본 발명을 완성하였다 (blast.ncbi.nlm.nih.gov).
- [0039] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드를 포함하는 실리카 합성용 조성물에 관한 것이다.
- [0040] 본 발명의 실리카 합성 펩타이드는 해양 생명체 유래의 펩타이드로서 실리카를 합성할 수 있는 활성을 가지고 있고, 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나로 표시될 수 있다. 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열을 가질 뿐만 아니라 펩타이드의 고유의 성질에 영향을 미치지 않는 범위에서 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열에 비해 보다 감소된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 펩타이드는 최소 5개 이상의 연속 아미노산 서열을 가질 수 있다. 더 구체적으로, 5개 이상 26개 이하의 연속 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.
- [0041] 가장 구체적으로, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(일명, RG)는 편모충류에 속하는 살핑고에카 에스피(*Salpingoeca sp.*) ATCC 50818의 CAMK/TSSK protein kinase의 아미노산 서열 294번부터 319번까지이며, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(일명, Sal_p1)는 상기 서열번호 1의 펩타이드의 크기를 줄인 아미노산 서열 300번부터 319번까지이며, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(일명, Ect_p1)는 갈조류인 엑토카퍼스 실리쿨로서스(*Ectocarpus siliculosus*) 유래의 기능이 밝혀지지 않은 단백질(Gene bank accession No. CBJ26926)의 아미노산 서열 2833번에서 2851번까지이며, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(일명, Ect_p2)는 상기 서열번호 3의 펩타이드와 같은 단백질의 아미노산 서열 1674번에서 1686번까지이며, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(일명, Vol_p1)는 볼복스 유래의 기능이 알려지지 않은 단백질(Gene bank accession No. XP_002959480)의 아미노산 서열 10

번부터 24번까지이며, 서열번호 6 및 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드(일명, 각각 Vol_p2, Vol_p3)는 볼복스 유래의 기능이 알려지지 않은 단백질(Gene bank accession No. XP_002954619)의 아미노산 서열 461번부터 474번까지 및 630번부터 643번까지일 수 있다.

- [0042] 상기 펩타이드는 펩타이드를 합성하는 당해 분야의 공지된 방법에 의하여 제조할 수 있다. 예를 들어 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템 또는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다.
- [0043] 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 상온 및 상압의 조건에서 약염기의 수용액 하에서 실리카 전구체와 반응하여 실리카를 합성할 수 있다.
- [0044] 상기 수용액은 바람직하게는 pH 6 내지 8의 완충용액으로서, 완충용액의 종류 및 농도는 특별히 제한되지 아니하나, 실리카 합성용 조성물의 적용 용도에 따라 적절히 변경할 수 있을 것이다.
- [0045] 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 에틸 트리에톡시실란, 티타니아 테트라이소프로폭사이드, 또는 테트라에틸 게르마늄 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 실리카 상에 효소 또는 결합 펩타이드를 고정하는데 사용할 수 있다.
- [0047] 따라서, 본 발명의 실리카 합성용 조성물은 효소 또는 결합 펩타이드를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 이를 위해, 효소 또는 결합 펩타이드의 유전자에 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드 코딩 유전자를 결합시켜 융합 단백질 형태로 포함되거나, 실리카 합성 시 효소 또는 결합 펩타이드를 첨가하여 실리카 복합체에 고정하는 형태로 포함될 수 있다.
- [0049] 상기 효소의 종류는 적용 용도에 따라 적절히 선택하여 사용할 수 있어 특별히 제한하지는 않는다. 예컨대, 호스 래디쉬 페록시다아제 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 상기 결합 펩타이드는 항체, DNA 또는 RNA와 특이적으로 결합하는 펩타이드, 또는 수용체 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0051] 상기 효소 또는 결합 펩타이드가 고정된 실리카는 상기 융합 단백질과 실리카 전구체를 반응시켜 실리카에 의해 상기 융합 단백질이 코팅되도록 하거나, 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 효소 또는 결합 펩타이드를 일정 비율로 혼합하여 반응시켜 원심분리하여 제조할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 실리카 합성용 조성물은 자기조립이 가능한 단백질, 또는 나노튜브 또는 나노메시 등의 미세 구조를 더 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 자기조립이 가능한 단백질은 페리틴(ferritin), 또는 바이러스 캡시드 단백질일 수 있다.
- [0054] 상기 페리틴은 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 *pfr* 유전자가 생산하는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 페리틴(HP0653)으로서, 금속이온의 저장 및 운송 역할을 하며, 원핵생물 유래이므로 대장균(*E. coli*)에서 가용성 단백질로 과발현 될 수 있는 장점이 있다. 또한, 상기 페리틴은 자기조립 시 N-말단이 외부로 나오기 때문에 N-말단에 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드 또는 실리카테인을 링커 없이 바로 연결할 수 있는 특징이 있다.
- [0055] 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 자기조립이 가능한 단백질의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 양쪽에 동시에 결합하거나, 리간드를 통해 고유의 성질에 영향을 미치지 않는 범위에서 그의 위치에 상관없이 결합될 수 있다. 따라서, 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드와 자기조립이 가능한 단백질의 융합 단백질은 고유의 성질에 영향을 미치지 않는 범위에서 그의 위치에 상관없이 결합되어 형성된 모든 융합 단백질을 의미한다.
- [0056] 상기 미세 구조는 나노 튜브 또는 나노메시 (nanomesh) 등일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0057] 또한 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드와 실리카 전구체를 반응시켜 실리카를 합성할 때 침전물로 묻치지 않고 단일막으로 도포될 수 있도록 인지질을 함께 사용할 수 있다.
- [0058] 상기 실리카 단일막은 통상의 실리카 합성 조건에서 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 인지질을 반응시켜 얻을 수 있다.

- [0059] 또한, 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드 및 실리카 전구체에 인지질을 적당한 비율로 혼합하여 유무기 복합체를 형성한 후 상기 유무기 복합체에 열이나 유기용매를 처리하여 유기물을 제거함으로써 다공성 실리카 구조체를 제조할 수 있다.
- [0060] 또한 본 발명의 실리카 합성용 조성물은 유기물 외에 하이드록시아파타이트와 같은 무기물을 이용하여 실리카 합성에 사용함으로써 실리카 복합체를 제조할 수 있다.
- [0061] 상기 실리카 복합체는 통상의 실리카 합성 조건에서 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 하이드록시아파타이트를 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0062] 상기 실리카 복합체는 골대체 소재 및 치아 대체 소재로 활용될 수 있으며 골세포분화 배지의 세포배양 코팅제, 3차원 스캐폴드에 활용될 수 있다.
- [0063] 본 발명은 서열번호 1 내지 10에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드; 및 자기조립이 가능한 단백질을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.
- [0064] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질을 포함하는 실리카 합성용 조성물을 제공하는 특징이 있다.
- [0065] 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 자가구조체를 형성할 수 있는 자기조립이 가능한 단백질과 결합하여 나노구조체를 형성할 수 있다. 이러한 나노구조체는 상기 펩타이드와 자기조립이 가능한 단백질의 융합 단백질 형태로부터 형성될 수 있다.
- [0066] 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 자기조립이 가능한 단백질의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 양쪽에 동시에 결합하거나, 리간드를 통해 고유의 성질에 영향을 미치지 않는 범위에서 그의 위치에 상관없이 결합될 수 있다. 따라서, 본 발명의 융합 단백질은 고유의 성질에 영향을 미치지 않는 범위에서 그의 위치에 상관없이 결합되어 형성된 모든 융합 단백질을 의미한다.
- [0067] 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 서열번호 1 내지 7에 기재된 펩타이드 외에 실라핀 R5(서열번호 8), His-Taq으로 사용되는 서열(서열번호 9), 실라핀 R5와 His-Taq이 연결된 서열(서열번호 10) 등을 사용할 수 있다.
- [0068] 상기 자기조립이 가능한 단백질의 종류는 상술한 바와 같다.
- [0069] 또한, 상기 융합 단백질은 발현 및 정제 효율을 높이기 위해 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 양쪽에 동시에 His-Tag을 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 융합 단백질은 효소 또는 결합 펩타이드, 형광단백질 등의 이중 단백질을 추가로 연결할 수 있다.
- [0071] 상기 융합 단백질은 펩타이드를 합성하는 당해 분야의 공지된 방법에 의하여 제조할 수 있다. 예를 들어 유전자 재조합과 단백질 발현 시스템 또는 펩타이드 합성기 등을 통하여 시험관내에서 합성하는 방법에 의하여 제조할 수 있다.
- [0072] 따라서, 본 발명은 상기 융합 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0073] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [0074] 본 발명의 일 구체예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pDuet 벡터를 사용하여 본 발명의 펩티드 코딩 유전자(서열번호 11)와 실리카 합성 펩타이드로서, 실라핀 R5 코딩 유전자(서열번호 8)를 포함하는 DNA 절편을 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였다.
- [0075] 본 발명은 또한 상기 융합 단백질을 발현하는 재조합 벡터로 형질도입된 형질전환체를 제공한다.
- [0076] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용

한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 셀페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

- [0077] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [0078] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [0079] 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 재조합 벡터 pDuet-R5Pfr를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조하였다.
- [0080] 본 발명은 또한 상기 융합 단백질을 발현하는 재조합 벡터로 형질도입된 형질전환체의 배양물을 분리 정제하는 단계를 포함하는 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0081] 상기 융합 단백질은 통상의 배양방법에 따라 형질전환체를 배양하여 정제하는 것이 바람직하다. 상기 융합 단백질은 재조합 벡터에 도입되는 인서트 즉, 코딩 유전자의 염기서열에 따라 사이토카인 생산능에 영향을 주지 않을 정도로 아미노산 서열의 일부에 얼마든지 변형이 있을 수 있다. 상기 변형은 결실, 삽입 또는 치환에 의한 변형을 의미한다.
- [0082] 본 발명은 또한 상기 융합 단백질에 특이적으로 결합하는 다클론성 항체를 제공한다.
- [0083] 상기 다클론성 항체의 제조방법은 특별히 제한하지는 않으나, 다음의 방법에 따라 제조하는 것이 바람직하다.
- [0084] 본 발명의 융합 단백질을 SPF (specific pathogen free) 동물에 1 내지 수회 주사하여 면역화시킨다. 최종 면역 후 일정 시간이 지난 뒤에 전혈하여 혈청만 취해 본 발명의 단백질에 대한 다클론성 항체를 얻는다.
- [0085] 상기 면역화 동물은 통상 면역화에 사용되는 동물이면 특별히 제한하지 않으나, 랫트인 것이 바람직하다. 상기 면역화를 위한 주사 횟수, 기간 및 투여방법은 당업자 수준에서 변형 또는 변경가능하므로 특별히 제한하지 않는다.
- [0086] 상기 자기조립이 가능한 단백질이 융합된 실리카는 상기 융합 단백질과 실리카 전구체를 반응시켜 실리카에 의해 상기 융합 단백질이 코팅되도록 하여 제조할 수 있다.
- [0087] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 또는 상기 융합 단백질과 실리카 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 실리카 합성방법에 관한 것이다.
- [0088] 본 발명의 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 상온 및 상압의 조건에서 약염기 즉, pH 6 에서 8의 수용액 하에서 실리카 전구체와 반응하여 실리카를 합성할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 실리카 합성방법을 보다 구체적으로 설명하면, 0.1M KH_2PO_4 완충용액(pH 6 내지 8), 1mM HCl 용액에 녹아 있는 실리카 전구체 및 본 발명의 펩타이드를 0.01 내지 1%의 중량비로 혼합하고, 상온, 상압의 조건에서 반응시킨 후 원심분리하여 실리카를 침전시킨다.
- [0090] 상술한 바와 같이, 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드를 이용하여 상온, 상압의 조건에서 약염기의 수용액 하에서 다기능성 실리카를 합성할 수 있어 환경적으로 유해한 부산물의 생성에 따른 종래기술의 문제점을 해소할 수 있다.
- [0091] 또한, 본 발명의 실리카 합성방법은 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 효소 또는 결합 펩타이드를 반응시키거나, 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드와 효소 또는 결합 펩타이드의 융합 단백질과 실리카 전구체의 반응을 통해 효소 또는 결합 펩타이드가 고정된 실리카를 합성할 수 있다.

- [0092] 이 경우, 실리카에 의해 상기 융합 단백질이 코팅되도록 하거나, 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 효소 또는 결합 펩타이드를 일정 비율로 혼합하여 반응시켜 원심분리하여 제조할 수 있다.
- [0093] 또한, 본 발명의 실리카 합성방법은 통상의 실리카 합성 조건에서 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 나노 튜브 또는 나노메시 등의 특정 미세구조를 반응시켜 상기 미세구조와 복합 실리카 구조체를 형성할 수 있다.
- [0094] 또한, 본 발명의 실리카 합성방법은 통상의 실리카 합성 조건에서 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 인지질을 반응시켜 실리카를 합성할 때 침전물로 뭉치지 않고 단일막으로 도포될 수 있도록 실리카 단일막 형태로 제조할 수 있다.
- [0095] 또한, 본 발명의 실리카 합성방법은 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 인지질을 반응시켜 유무기 복합체를 제조하는 단계; 및 상기 유무기 복합체에 열 또는 유기용매 처리하여 유기물을 제거하는 단계를 거쳐 다공성 실리카를 합성할 수 있다.
- [0096] 또한, 본 발명의 실리카 합성방법은 유기물 외에 하이드록시아파타이트와 같은 무기물을 이용하여 실리카 합성에 사용함으로써 실리카 복합체를 제조할 수 있다.
- [0097] 상기 실리카 복합체는 통상의 실리카 합성 조건에서 상기 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드, 실리카 전구체 및 하이드록시아파타이트를 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0098] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체에 관한 것이다.
- [0099] 본 발명의 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드는 자기조립이 가능하여 실리카 합성 반응에 의해 자기 캡슐화 반응이 나타나 구형의 자기조립 구조체 형태를 띠며, 합성된 실리카는 상기 자기조립 구조체의 표면을 코팅하여 실리카 복합체를 형성할 수 있다.
- [0100] 상기 실리카 복합체는 펩타이드와 실리카로 이루어진 복합 셸 내에 빈 공동이 형성된 캡슐구조, 또는 펩타이드가 코어부를 형성하고 실리카가 셸부를 형성하는 코어-셸 구조 둘 다를 가질 수 있다.
- [0101] 상기 캡슐형을 위해서는 코어를 형성할 수 있는 구형의 자기조립이 가능한 단백질 예를 들어 12nm 정도의 구를 형성할 수 있는 페리틴 단백질과 융합하거나, 코어-셸 고분자 나노구형체와 펩타이드를 융합하여 구형의 실리카 구조체를 형성 후 소결을 통해 내부를 태우면 캡슐형을 얻을 수 있다.
- [0102] 또한, 리포솜을 주형으로 할 경우 속이 빈 캡슐형 실리카를 얻을 수 있다. 또한 펩타이드에 의한 실리카 구조체가 코어-셸 구조를 이룰 수 있으므로 이를 코어로 실리카가 셸부를 형성하는 코어-셸 구조를 가질 수 있다.
- [0103] 따라서, 본 발명은 서열번호 1 내지 7에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 및 실리카 전구체를 반응시켜 자기 캡슐화(autoencapsulation)를 통해 상기 펩타이드의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 실리카 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0104] 상기 실리카 복합체는 상온 및 상압의 조건에서 pH 6 내지 8의 수용액 하에서 상기 펩타이드 및 실리카 전구체를 반응시켜 합성할 수 있다.
- [0105] 상기 실리카 전구체의 종류는 전술한 바와 같다.
- [0106] 또한, 상기 실리카 복합체에 있어서, 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 양쪽에는 화학적, 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의하여 직접 또는 다른 매개체를 이용하여 간접적으로 연결될 수 있는 형광물질, 조직 특이적 성분, 약제학적 활성성분, 효소 또는 결합 펩타이드, 미세 구조, 인지질, 또는 하이드록시아파타이트 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0107] 상기 형광물질은 특별히 제한되지는 않으나, 예컨대, Dylight 488 NHE-ester dye, Vybrant™ DiI, Vybrant™ DiO, 양자점(quantum dots) 나노입자, 플루오로세인, 로다민, 루시퍼 엘로우, B-파이트오테리쓰린, 9-아크리딘이소티오시아네이트, 루시퍼 엘로우 VS, 4-아세트아미도-4'-이소티오-시아나토스틸벤-2,2'-다이설폰산, 7-다이에틸아미노-3-(4'-이소티오시아토펜)-4-메틸쿠마린, 석시니미딜-파이렌부티레이트, 4-아세트아미도-4'-이소티오시아나토스틸벤-2,2'-다이설폰산 유도체, LC™-Red 640, LC™-Red 705, Cy5, Cy5.5, 리사민, 이소티오시아네이트

트, 에리쓰로신 이소티오시아네이트, 다이에틸렌트리아민 펜타아세테이트, 1-다이메틸아미노나프틸-5-설포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 설포네이트, 2-소티토우이디닐-6-나프탈렌 설포네이트, 3-페닐-7-이소시아나토쿠마린, 9-이소티오시아나토아크리딘트, 크리딘 오렌지 9-이(소티(2-벤족사조일릴)페닐)멜레이미드 사디아졸, 스틸벤, 파이렌, 이벤도체, 형광 물질을 포함한 실리카, II/IV족 반도체 양자점, III/V족 반도체 양자점, IV족 반도체 양자점, 또는 이다성분 혼성 구조체를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 상기 형광물질은 양자점(quantum dots) 나노입자, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, ICG(indocyanine green), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, Rhodamine800, 란타나이드 계열 및 Texas Red로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 사용할 수 있고, 상기 양자점(quantum dots) 나노입자인 경우에는 II-VI 또는 III-V족 화합물을 사용할 수 있다. 이 경우 상기 양자점 나노입자는 CdSe, CdSe/ZnS, CdTe/CdS, CdTe/CdTe, ZnSe/ZnS, ZnTe/ZnSe, PbSe, PbS InAs, InP, InGaP, InGaP/ZnS 및 HgTe로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 사용할 수 있다.

- [0108] 상기 조직 특이적 결합성분은 항원, 항체, RNA, DNA, 합텐(hapten), 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴(lectin), 셀렉틴(selectin), 방사선 동위원소 표지성분, 또는 종양 마커 등과 특이적으로 결합할 수 있는 물질일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0109] 상기 약제학적 활성성분은 siRNA, 안티센스, 항암제, 항생제, 호르몬, 호르몬길항제, 인터루킨, 인터페론, 성장인자, 종양 괴사 인자, 엔도톡신, 림포톡시, 유로키나제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성제, 프로테아제 저해제, 알킬포스포콜린, 방사선 동위원소로 표지된 성분, 심혈관계 약물, 위장관계 약물, 또는 신경계 약물 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0110] 본 발명의 실리카 복합체는 효소 또는 결합 펩타이드가 실리카 복합체에 고정될 수 있고, 발색반응, 형광반응, 발광반응, 전기화학적 반응 등을 통해 특정 핵산, 단백질, 다당류 또는 병원균 등을 검출할 수 있는 바이오센서로 사용할 수 있다.
- [0111] 상기 효소 또는 결합 펩타이드의 종류는 상술한 바와 같다.
- [0112] 본 발명의 실리카 복합체는 자가 조립 구조를 이용하여 나노 튜브 또는 나노메시 등의 특정 미세구조와 복합 구조체를 형성할 수 있다.
- [0113] 상기 실리카 복합체에 인지질이 포함될 경우, 실리카 유기 복합체를 형성하거나, 유기물 제거 과정을 통한 다공성 실리카 구조체가 형성될 수 있다.
- [0114] 상기 실리카 복합체에 하이드록시아파타이트가 포함될 경우, 무기물과의 실리카 기반 복합체가 형성될 수 있다.
- [0115] 따라서, 다양한 기능성 성분들이 결합된 본 발명의 실리카 복합체는 약물전달체, 핵산, 단백질, 다당류 또는 병원균 검출용 바이오센서, 골대체제, 세포배양 코팅제, 3차원 스캐폴드, 조영제, 진단 프로브, 기능성 섬유, 필터 등에 사용할 수 있다.
- [0116] 본 발명은 또한 서열번호 1 내지 10에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 펩타이드 및 자기조립이 가능한 단백질의 자기조립 구조체의 표면이 실리카로 코팅되어 있는 실리카 복합체에 관한 것이다.
- [0117] 상기 자기조립이 가능한 단백질이 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드와 결합된 융합 단백질인 경우, 상기 융합 단백질과 실리카 전구체를 반응시킬 때, 자기조립이 가능한 단백질이 코어-셸 구조의 자기조립 구조체를 형성하고, 상기 자기조립 구조체를 주형으로 하여 구조체에 연결되어 있는 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드에 의해 실리카 전구체로부터 실리카를 합성함으로써 자기조립 구조체의 표면에 실리카가 코팅되어 있는 구조를 합성할 수 있다.
- [0118] 상기 자기조립이 가능한 단백질의 종류는 상술한 바와 같다.
- [0119] 상기 자기조립이 가능한 단백질의 N-말단, C-말단, 또는 N-말단과 C-말단 양쪽에는 화학적, 물리적 공유 또는 비공유 결합에 의하여 직접 또는 다른 매개체를 이용하여 간접적으로 연결될 수 있는 금속이온, 동위원소, 형광 물질, 조직 특이적 성분, 약제학적 활성 성분, 효소 또는 결합 펩타이드, 나노튜브, 나노메시 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0120] 상기 금속이온은 철, 망간, 구리, 코발트, 또는 이들의 합금일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0121] 본 발명은 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약물전달체에 관한 것이다.
- [0122] 본 발명의 실리카 복합체는 코어-셸 구조를 하고 있어 상술한 바와 같은 약제학적 활성성분을 운반하는데 특히 적합하다.
- [0123] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0124] 또한, 본 발명의 약물전달체는 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0125] 한 양태로서, 본 발명에 따른 약물전달체는 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0126] 본 발명의 약물전달체의 다른 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다.
- [0127] 또한, 상기 멸균 주사용 제제는 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.
- [0128] 본 발명의 약물전달체의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0129] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.
- [0130] 본 발명의 실리카 복합체는 형광물질이 물리화학적으로 결합되어 있어 자기공명 및 광학 영상 장치 등을 통해 표적 부위의 이미징이 가능한 조영제로 사용할 수 있다.
- [0131] 본 발명의 조영제 조성물은 진단 대상에서 분리한 조직 또는 세포에 투여하여 형광 실리카 복합체가 발산하는 신호를 감지하여 영상을 획득하는데 이용될 수 있다.
- [0132] 상기 형광 실리카 복합체에 의해 발산되는 신호를 감지하기 위해서는 자기공명영상장치(MRI)와 광학 이미징의 이용이 바람직하다.
- [0133] 자기공명영상장치는 강력한 자기장 속에 생체를 넣고 특정 주파수의 전파를 조사하여 생체조직에 있는 수소 등의 원자핵에 에너지를 흡수시켜 에너지가 높은 상태로 만든 후, 상기 전파를 중단하여 상기 수소 등의 원자핵 에너지가 방출되게 하고 이 에너지를 신호로 변환하여 컴퓨터로 처리하여 영상화한 장치이다. 자기 또는 전파는 골에 방해받지 않기 때문에 단단한 골 주위 또는 뇌나 골수의 종양에 대하여 종단, 횡단, 임의의 각도에서 선명한 입체적인 단층상을 얻을 수 있다. 특히 상기 자기공명영상장치는 T2 스핀-스핀 이완 자기공명영상장치인 것이 바람직하다.
- [0134] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물

에 관한 것이다.

- [0135] 본 발명의 실리카 복합체는 형광물질이 결합되어 있어 형광성을 가짐과 동시에 조직 특이적 결합성분이 연결되어 있어 표적지향이 가능하여 자기공명 및 광학 영상 장치 등을 통해 표적 부위의 이미징이 가능한 조영제로 사용할 수 있다.
- [0136] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물에 관한 것이다.
- [0137] 본 발명의 실리카 복합체는 약제학적 활성성분과 물리 화학적으로 결합하여 실리카 복합체의 형광성을 동시에 포함하고 있어 자기공명 및 광학 영상 장치 등을 통해 생체 분자의 분리, 진단 또는 치료 등의 나노 프로브 및 약물 또는 유전자 전달체(delivery vehicle) 등에 이용할 수 있다.
- [0138] 상기 실리카 복합체를 이용한 생체 진단의 한 대표적인 예로서 분자 자기공명영상 진단 또는 자기 이완 센서(magnetic relaxation sensor)를 들 수 있다. 실리카 복합체는 그 크기가 커짐에 따라 더 큰 T2 조영효과를 나타내는데, 이러한 성질을 이용하면 생체 분자를 검출하는 센서로 사용될 수 있다. 즉, 특정한 생체 분자가 실리카 합성 활성이 있는 펩타이드의 엉킴을 유도하게 되면 이에 의해 T2 자기 공명 영상 효과가 증대된다. 이러한 차이를 이용하여 생체 분자를 검출한다.
- [0139] 또한, 본 발명의 실리카 복합체는 종양과 관련된 다양한 질병, 예를 들어 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암 및 자궁경부암을 진단 및/또는 치료하는데 이용될 수 있다.
- [0140] 보다 구체적으로 설명하면, 종양 세포는 정상 세포에서는 거의 또는 전혀 생산되지 않는 특정 물질을 발현 및/또는 분비하는데 이들을 일반적으로 "종양 마커(tumor marker)"라 명명한다. 그러한 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 상기 실리카 복합체에 결합시켜 종양 진단에 유용하게 이용될 수 있다. 당업계에는 다양한 종양 마커뿐만 아니라 이들과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 공지되어 있다.
- [0141] 또한 상기 종양 마커는 작용 기작에 따라 리간드, 항원, 수용체, 및 이들을 코딩하는 핵산으로 분류할 수 있다.
- [0142] 종양 마커가 "리간드"인 경우에는 상기 리간드와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 본 발명에 따른 실리카 복합체에 도입할 수 있는데 상기 리간드와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체 또는 항체가 적합할 것이다. 본 발명에서 이용 가능한 리간드 및 이와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체의 예로는 시냅토타그민의 C2(synaptotagmin의 C2)와 포스포티딜세린, 아넥신 V(annexin V)와 포스포티딜세린, 인테그린(integrin)과 이의 수용체, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)와 이의 수용체, 안지오펜티오텐(angiotensin)과 Tie2 수용체, 소마토스타틴(somatostatin)과 이의 수용체, 바소인테스티날 펩타이드(vasointestinal peptide)와 이의 수용체 등이 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0143] 종양 마커가 "수용체"인 대표적인 예는 난소암 세포에서 발현되는 폴산 수용체가 있다. 상기 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 물질(폴산 수용체의 경우에는 폴산)이 본 발명에 따른 실리카 복합체에 도입될 수 있는데 상기 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 리간드 또는 항체가 적합할 것이다.
- [0144] 종양 마커가 "항원"인 경우 상기 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 본 발명에 따른 실리카 복합체에 도입할 수 있는데 상기 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 적합할 것이다. 본 발명에서 이용 가능한 항원 및 이와 특이적으로 결합하는 항체의 예로는 암성 태아성 항원(carcinoembryonic antigen - 대장암 표지 항원)과 허셉틴(Genentech, USA), HER2/neu 항원(HER2/neu antigen - 유방암 표지 항원)과 허셉틴, 전립선 특이 항원(prostate-specific membrane antigen - 전립선암 표지 항원)과 리투산(IDCE/Genentech, USA) 등이 있다. 이러한 항체는 상업적으로 입수하거나 당업계에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 일반적으로 포유동물(예, 마우스, 랫트, 염소, 토끼, 말 또는 양)을 적절한 양의 항원으로 1회 이상 면역화시킨다. 일정 시간 후 역가가 적정 수준에 이르렀을 때, 포유동물의 혈청으로부터 회수한다. 회수한 항체는 원하는 경우 공지된 공정을 이용하여 정제하고 사용 시까지 냉동 완충된 용액에 저장할 수 있다. 이러한 방법의 상세한 사항은 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0145] 한편, 상기 "핵산"은 전술한 리간드, 항원, 수용체 또는 이의 일부분을 코딩하는 RNA 및 DNA를 포함한다. 핵산은 당업계에 알려진 바와 같이 상보적인 서열 간에 염기쌍(base pair)을 형성하는 특징을 갖고 있기 때문에 특정 염기서열을 갖는 핵산은 상기 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 핵산을 이용하여 검출할 수 있다. 상기

효소, 리간드, 항원, 수용체를 코딩하는 핵산과 상보적인 염기서열을 갖는 핵산을 본 발명에 따른 실리카 복합체에 도입할 수 있다.

[0146] 또한, 핵산은 5' 및 3' 말단에 $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$ 등의 작용기가 있어 실리카 복합체와 결합하는데 유용하게 이용될 수 있다.

[0147] 이러한 핵산은 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예를 들면 자동 DNA 합성기(예, 바이오써치, 어플라이드 바이오시스템스 등으로부터 구입할 수 있는 것)를 사용하여 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 문헌(Stein *et al.* *Nucl. Acids Res.* 1988, vol.16, p.3209)에 기술된 방법에 의해 합성할 수 있다. 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오타이드는 조절된 유리 중합체 지지체를 사용하여 제조할 수 있다(Sarin *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, vol.85, p.7448).

[0148] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체; 및 진단 프로브를 포함하는 다중 진단 프로브에 관한 것이다.

[0149] 상기 진단 프로브는 T1 자기공명 영상 진단 프로브, 광학 진단 프로브, CT 진단 프로브, 또는 방사선 동위원소 등을 사용할 수 있다.

[0150] 상기 다중 진단 프로브는 예를 들면, 형광 실리카 복합체에 T1 자기공명 영상 진단 프로브를 결합시키면 T2 자기공명영상 및 T1자기공명영상 진단을 동시에 진행할 수 있고, 광학 진단 프로브를 결합시키면 자기공명 영상과 광학 이미징을 동시에 할 수 있으며, CT 진단 프로브를 결합시키면 자기공명영상과 CT 진단을 동시에 할 수 있다. 또한 방사선 동위원소와 결합시키면 자기공명영상과 PET, SPECT 진단을 동시에 할 수 있다.

[0151] 상기 T1 자기공명 영상 진단 프로브로는 Gd 화합물, 또는 Mn화합물 등을 포함하며, 광학 진단 프로브로는 유기 형광 염료(dye), 양자점, 또는 염료 표지(dye labelled) 무기 지지체(예 SiO_2 , Al_2O_3))를 포함하며, CT 진단 프로브로는 I(요오드) 화합물, 또는 금 나노 입자를 포함하고, 방사선 동위원소로는 In, Tc, 또는 F 등을 포함한다.

[0152] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체가 전기방사된 섬유 또는 필터에 관한 것이다.

[0153] 본 발명의 실리카 복합체는 전기방사법을 이용하여 섬유상 바이오 실리카와 같은 구조체를 형성할 경우, 다양한 필터 및 기능성 섬유 제조에 사용될 수 있다.

[0154] 또는, 유전공학적 방법으로 펩타이드와 기능성 단백질을 융합하여 전기방사할 경우 기능성이 부여된 섬유 제조가 가능하다.

[0155] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체를 포함하는 골대체제, 치아대체제, 골세포분화배지의 세포배양코팅제 또는 3차원 스캐폴드 소재로서의 용도에 관한 것이다.

[0156] 본 발명의 실리카 복합체는 하이드록시아파타이트를 포함할 경우, 실리카 기반 복합체 형성을 통해 골대체제, 치아대체제, 골세포분화배지의 세포배양코팅제, 3차원 스캐폴드 등에 사용할 수 있다.

[0157] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체를 포함하는 포토닉스 소자에 관한 것이다.

[0158] 본 발명의 실리카 복합체는 반도체 기관 표면에 흡착되어 나노 스케일의 바이오 실리카를 형성할 수 있어 포토닉스 소자에 사용될 수 있다.

[0159] 본 발명은 또한 상기 실리카 복합체를 포함하는 바이오분자 검출용 바이오센서에 관한 것이다.

[0160] 본 발명의 실리카 복합체는 효소 또는 결합 펩타이드가 고정될 수 있어 핵산, 단백질, 다당류, 또는 병원균 등의 바이오분자 검출을 위한 바이오센서로 사용할 수 있다.

[0161] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명

의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0162] <실시예 1> 해양중 유래의 실리카 합성 펩타이드 검색

[0163] 다양한 해양중으로부터 실리카를 합성할 수 있는 다양한 아미노산 서열이 존재할 것으로 가정하고 단백질 합성 후 변형(post-translation modification)에 중요한 하이드록시기(-OH)와 아민기(-NH₂)를 잔기로 갖는 아미노산인 세린, 라이신, 아르기닌, 히스티딘 등의 비율이 높은 아미노산 서열을 나타내는 펩타이드를 쿼리로 사용하여 미국 NCBI의 단백질 데이터베이스로부터 새로운 실리카 합성 펩타이드를 탐색하였다 (blast.ncbi.nlm.nih.gov). 검색된 단백질 중에서 해양중으로부터 생산되는 단백질을 선별하고 단백질 내에 존재하는 실리카 합성 가능성이 예상되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 7종을 선택하였다(표 1).

표 1

펩타이드 서열 및 유래

서열 번호	명칭	아미노산 서열	유래
1	RG	RRRRRGCGRRRGGRGGRGGCGRRR	CAMK/TSSK protein kinase from <i>Salpingoeca</i> sp. ATCC50818 Accession No. EGD72728 amino acid 294 to 319
2	Sal_p1	CGRRRGGRGGRGGRGGCGRRR	CAMK/TSSK protein kinase from <i>Salpingoeca</i> sp. ATCC50818 Accession No. EGD72728 amino acid 300 to 319
3	Ect_p1	SSRSSSHRRHDHHDHRRGS	hypothetical protein Esi_0050_0074 from <i>Ectocarpus siliculosus</i> Accession No. CBJ26926 amino acid 2833 to 2851
4	Ect_p2	SSKKSGERHHRSA	hypothetical protein Esi_0050_0074 from <i>Ectocarpus siliculosus</i> Accession No. CBJ26926 amino acid 1674 to 1686
5	Vol_p1	SGRRRGSRRRGSRRR	hypothetical protein VOLCADRAFT_33984 from <i>Volvox carteri</i> f. nagariensis Accession No. XP_002959480 Amino acid 10 to 24
6	Vol_p2	SRLRGRRLSPGR	hypothetical protein VOLCADRAFT_95499 from <i>Volvox carteri</i> f. nagariensis Accession No. XP_002954619 Amino acid 461 to 474
7	Vol_p3	SSRHHHDHHDHHDH	hypothetical protein VOLCADRAFT_95499 from <i>Volvox carteri</i> f. nagariensis Accession No. XP_002954619 Amino acid 630 to 643

[0164]

[0165] No.1 펩타이드(서열번호 1)는 편모충류에 속하는 *Salpingoeca* sp. ATCC 50818의 CAMK/TSSK protein kinase의 아미노산 서열 294번부터 319번까지를 선택하고 RG로 명명하였다. No.2(서열번호 2)는 RG의 크기를 줄여 아미노산 서열 300번부터 319번까지 선택하여 Sal_p1으로 명명하였다. No.3(서열번호 3)은 갈조류인 *Ectocarpus siliculosus* 유래의 기능이 밝혀지지 않은 단백질 (Gene bank accession No. CBJ26926)의 아미노산 서열 2833번에서 2851번까지를 Ect_p1으로 명명하고 No. 4(서열번호 4)는 같은 단백질의 아미노산 서열 1674번에서 1686번까지를 선택하여 Ect_p2로 명명하였다. No. 5(서열번호 5)는 볼복스 유래의 기능이 알려지지 않은 단백질 (Gene bank accession No. XP_002959480)의 아미노산 서열 10번부터 24번까지를 선택하여 Vol_p1으로 명명하였다. No.6과 No.7 펩타이드(서열번호 6 및 7)는 볼복스 유래의 기능이 알려지지 않은 단백질 (Gene bank accession No. XP_002954619)의 아미노산 서열 461번부터 474번까지와 630번부터 643번까지 선택하고 각각 Vol_p2와 Vol_p3로 명명하였다.

[0166] 7가지 펩타이드는 펩트론 사(Pepton co. Daejeon, Korea)에 합성을 의뢰하여 순도 90% 의 합성 펩타이드를 얻었다. 합성된 펩타이드들의 이론적 특성은 PepDraw 프로그램 (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html>)을 이용하여 분석하였고 표 2에 정리하였다.

표 2

펩타이드의 기본적 성질

명칭	길이 (a.a)	분자량	등전점	총 전하	소수성
RG	26	2979.6553	13.05	+14	+44.70 Kcal * mol ⁻¹
Sal_p1	20	2142.1294	12.79	+9	+34.5 Kcal*mol ⁻¹
Ect_p1	19	2297.1066	12.31	+3	+39.79 Kcal*mol ⁻¹
Ect_p2	13	1467.7633	11.54	+3	+28.9 Kcal*mol ⁻¹
Vol_p1	15	1722.0436	13.39	+9	+29.02 Kcal*mol ⁻¹
Vol_p2	14	2921.6813	13.26	+7	+21.43Kcal*mol ⁻¹
Vol_p3	14	1815.7892	6.95	0	+38.88 Kcal * mol ⁻¹

[0167]

[0168]

<실시예 2> 실리카 합성 펩타이드 종류별 실리카 합성 활성 조사

[0169]

합성된 펩타이드들의 실리카 합성 활성을 조사하기 위해 합성된 펩타이드를 2.5~5 mg/mL 농도가 되도록 3차 증류수로 녹인 후 Luckarift 등의 논문(Luckarift *et al*, 2004, *Nat Biotechnol* 22:pp.211-213)에서 제시된 방법을 따라 실리카 합성 활성을 조사하였다. 대조구로는 실라핀 R5 펩타이드(SSKKSGSYSGSKGSKRRIL: 서열번호 8)를 사용하였다.

[0170]

실험 방법을 구체적으로 기술하면 0.1M NaOH로 pH를 8로 맞춘 0.1M KH₂PO₄ 완충용액 80 μ l, 1mM HCl 용액에 녹아 있는 실리콘 단위체인 1M TMOS(tetramethyl orthosilicate) 용액을 10 μ l, 25 mg/mL의 펩타이드 용액 10 μ l 비율로 섞은 후 상온에서 5분간 반응시킨 후 14000g 에서 10초간 원심 분리하여 합성된 실리카를 침전시켰다. 알코올로 2번, 증류수로 2번 침전물을 수세한 후 공기 중에서 침전물을 건조시켰다. 건조된 실리카 침전물은 정량 분석을 위해 1M NaOH 용액에 넣어 95℃에서 30분간 반응시켜 분해시킨 후 몰리브데이트와 실리카가 반응하여 노란색의 발색 반응물을 형성하는 원리를 이용한 발색반응을 유도하였다. 이 반응에 사용된 용액들은 1M의 염산용액, 0.1N 황산용액에 녹인 2% 암모늄몰리브데이트(SolA), 5% 옥살산 용액(SolB), 10% 아세톤에 녹아있는 200mM 아스코브르산 용액과 0.6%의 SDS(sodium dodecyl sulfate) 용액을 1:1로 섞은 SolC 용액이며 각 용액의 기능은 첫째, HCl은 NaOH로 가수분해된 실리카를 중화하기 위해 첨가하고 둘째로 실리카를 발색시킬 몰리브데이트 용액인 SolA를 첨가하여 5분간 반응 시킨 후 인산기와 몰리브데이트와의 결합을 막기 위해 옥살산 용액인 SolB를 넣어준다. 마지막으로 SolC를 첨가하면 아스코브르산이 실리카와 몰리브데이트의 복합체를 환원시켜 노란색에서 푸른 색으로 변화시켜 색의 세기를 더 증폭시켜주는 역할을 한다.

[0171]

실리카 농도와 발색 세기가 비례 관계인 것을 이용하여 700 nm 에서의 흡광도를 읽어 합성된 실리카의 농도를 계산하였다.

[0172]

No.1 RG 펩타이드는 대조구인 R5 펩타이드와 마찬가지로 펩타이드를 넣자 마자 실리카 침전 반응이 나타났다. 다른 합성 펩타이드인 세린 잔기가 풍부한 GS 펩타이드(GSSSSGSSSSNNK: 서열번호 13)는 침전 반응이 나타나지 않았다(도 1 및 2).

[0173]

다음으로, RG 펩타이드에 비해 아미노산 개수를 줄여 용해성을 증가시킨 6종의 펩타이드를 추가로 합성하여 실리카 합성 활성을 비교하였다.

[0174]

도 3에 나타난 바와 같이, Ect_p1, Ect_p2, Sal_p1은 1mM HCl로 기질을 규산(silicic acid)으로 활성화 시킨 경우 실리카 합성율이 증가하였으나, Vol_p1, Vol_p2는 오히려 규산으로 기질을 전환시킨 경우 실리카 합성율이 감소하는 결과를 나타내었다.

[0175]

이러한 펩타이드별 활성 특징은 실리카 코팅이나 효소 고정화 사용시 유기물의 pH 안정성 및 활성을 고려하여 그에 맞는 실리카 합성 펩타이드를 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

[0176]

도 4는 본 발명의 펩타이드, EctP1, SalP1과 VolP2에 의해 형성된 실리카 침전물의 형태를 보여주는 주사전자현

미경 사진도로 펩타이드에 의한 실리카 합성은 pH 6~8 사이에서 반응이 잘 일어났고 펩타이드에 의한 구형 실리카 형성체의 직경은 작게는 200~300nm에서 크게는 1 μ m 이상까지 다양하였다.

- [0177] <실시예 3> 유전공학적 방법을 이용한 펩타이드와 유용 단백질의 융합
- [0178] 실리카 형성 펩타이드는 다양한 유용 단백질들과 유전공학적 방법으로 융합이 가능하기 때문에 가시적으로 단백질의 발현 양, 활성 및 위치 등을 확인할 수 있어 바이오센서 및 다양한 tag으로 사용되는 GFP와 펩타이드의 융합을 실시하였고 발현 벡터의 모식도는 도 5A에 나타내었다. 발현된 단백질은 SDS-PAGE로 확인하였다(도 5B).
- [0179] 실리카 형성 반응은 융합 단백질 1 내지 10 μ g이 포함된 0.1M NaH₂PO₄ 완충용액 90 μ l에 1mM HCl 용액에 녹아 있는 실리카 전구체인 1M TMOS(tetramethyl orthosilicate) 용액을 10 μ l를 에펜도르프 튜브에서 섞은 후 상온에서 5분간 반응 시킨 후 14000g 에서 30초간 원심 분리하여 합성된 실리카를 침전시켰다. GFP와 펩타이드 융합된 단백질에 의한 실리카 자가 캡슐화(autoencapsulation)의 형광현미경 사진은 도 5C에 나타내었다. GFP와 SalP1의 융합단백질에 의한 실리카 autoencapsulation의 주사현미경 사진을 도 6C에 나타내었으며 비특이적으로 형성된 실리카 (A)와 GFP (B)에 의해 형성된 실리카 침전물에 비해 일정 크기(200 nm)의 구형의 구조체를 형성하였다.
- [0180] GFP-SalP1에 의해 형성된 실리카의 성분을 에너지 분산 엑스레이 분광기 (EDX)로 분석한 결과 구형의 실리카 구조체 부분에서는 질소성분이 검출되는 반면 비특이적으로 침전되는 실리카 부분에서는 질소 성분이 검출 되지 않았다(도 7). 이를 통해 일정한 크기의 구형의 실리카 구조체는 GFP-SalP1에 의해 형성된 것임을 확인할 수 있었다.
- [0181] 실리카 형성 펩타이드들과 유전 공학적 융합을 통해 다양한 기능성 단백질들의 자가 캡슐화(autoencapsulation)에 의한 비드, 표면, 특정 구조체등에 고정화가 가능하다.
- [0182] <실시예 4> 실라핀 R5-페리틴 융합 단백질의 제조
- [0183] (Pfr 클로닝)
- [0184] 헬리코박터 파일로리(*H. pylori*) 26695 DNA로부터 5'-cgggatccgATGTTATCAAAAGACATCATTAAGTTGCTA-3' (PF: 서열번호 14)와 역전사 서열 5'-ccgCTCGAGTCATTAAGATTTCCTGCTTTTAGCGATC-3' (PR: 서열번호 15)를 이용하여 PCR을 통해 *pfr* 유전자(서열번호 11)를 증폭시킨 후 제한효소 *Bam*HI과 *Xho*I으로 처리한 후 같은 제한효소로 처리한 pDuet 벡터에 넣어 발현 벡터 pDuet-Pfr를 제조하였다(도 8 및 9).
- [0185] (실라핀 R5-페리틴 제조)
- [0186] 실라핀 R5-페리틴은 페리틴 N-말단에 실라핀 R5가 연결되어 발현되도록 벡터를 제작하였다. 상세히 설명하면 페리틴 발현 벡터인 pDuet-Pfr을 주형으로 하여 5'-CAGCAAAGGCAGCAAACGCCGATTCTGTTATCAAAAGACATCATTAAGTTGCTA-3' (SPF: 서열번호 16) 과 PR 로 1차 PCR을 수행하고 생산된 PCR 산물을 다시 주형으로 하여 5'-cgggatccGAGCAGCAAAAAAGCGGCAGCTATAGCGGCAGCAAAGGCAGCAAACGCCGATTCTG-3' (SF: 서열번호 17)와 PR을 이용하여 두 번째 PCR을 수행하여 실라핀 R5와 페리틴이 결합된 유전자를 얻었고 *Bam*HI과 *Xho*I으로 처리 후 같은 효소로 처리한 pDuet 벡터에 삽입하여 최종 pDuet-R5Pfr를 얻었다(도 10).
- [0187] (His-tag 없는 Pfr 발현)
- [0188] His-tag이 달린 페리틴을 대조구로 하여 His-tag이 달린 실라핀 R5-페리틴의 실리카 합성 활성을 측정한 결과 실라핀 R5-페리틴 뿐 아니라 His-tag이 달린 페리틴에서도 실리카 합성 활성이 나타났다.
- [0189] 이 결과에 따라 His-tag 서열 자체가 페리틴 어느 쪽에 실리카 합성 활성이 있는 것인지 확인하기 위해 His-tag이 없는 페리틴 발현을 시도하였다.
- [0190] pDuet 벡터의 *Nco*I과 *Xho*I 사이에 *pfr* 유전자를 삽입하고자 했을 때 *pfr* 유전자 내부에 *Nco*I 자리가 존재하여 pDuet 벡터는 *Nco*I와 *Xho*I으로 자르고 *pfr* 유전자는 *Nco*I 자리를 만들어 줄 수 있는 *Bsa*I 자리를 *pfr* 증폭을 위

한 정방향 프라이머의 5' 말단 서열에 첨가하여 *BsaI*로 자른 후 *NcoI* 자리가 만들어 질 수 있도록 하였다(5'-*gcccctctcgggtctccc*ATGTTATCAAAAGACATCAT TAAGTT-3'; *BsaI*_PF: 서열번호 18). *BsaI*_PF와 PR 이용하여 pfr 유전자를 증폭시킨 후 *BsaI*와 *XhoI*으로 자른 후 준비된 벡터에 삽입하여 His-tag이 없는 Pfr 발현 벡터를 제조 하였다(도 11).

- [0191] (재조합 페리틴의 발현을 위한 형질전환)
- [0192] T7 RNA 폴리머라제 유전자를 가지고 있는 *E.coli* BL21(DE3)에 각 생산 벡터를 형질전환 시켜 재조합 페리틴을 생산 균주를 확보하였다.
- [0193] (재조합 페리틴 생산)
- [0194] 페리틴 생산 벡터를 소유한 *E.coli* BL21(DE3) 콜로니 한 개를 50 μ g/mL의 암피실린이 들어 있는 LB 액체 배지 3 mL에 접종하여 37°C에서 배양시킨 다음, 대수기 증식기 상태의 균 배양액 0.1 mL를 50 mL의 LB (1.0% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 1% NaCl) 배지에 접종하여 37°C에서 200rpm으로 4시간 배양시킨 후 최종 농도가 0.1mM 이 되도록 IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하였다.
- [0195] 상기 IPTG를 첨가한 다음 37°C에서 3시간 동안 추가 배양시킨 다음 4°C, 4000rpm에서 20분간 원심 분리하여 균체를 수거한 후 완충용액(0.3M NaCl, 1mM PMSF 포함된 20mM 인산 완충용액(pH 8.0))으로 균체를 현탁한 후 라이소자임 0.5 mg/mL로 처리하여 실온에서 30분간 효소 반응시킨 후 냉동(-70°C/37°C)을 각각 3차례씩 반복하였다.
- [0196] 얻어진 균체를 40W 하에 10초씩 3회(1회마다 10초간 얼음에서 휴지) 반복으로 초음파 처리하여 균체를 파쇄하였고, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 수거하였다. His-tag이 달린 페리틴과 R5가 연결된 페리틴은 최종 0.3M NaCl이 함유된 20mM 인산 완충용액(pH 8)으로 평형화된 cobalt affinity column 크로마토그래피(Clone tech사의 talone resin 사용)를 수행하여 N-말단 부위에 6개의 히스티딘 잔기가 연결된 재조합 페리틴 단백질을 150mM 이미다졸로 용출시켰다. 균체를 파쇄하고 원심분리하여 얻은 상청액을 이용하여 각 페리틴의 발현양과 분자량 확인을 위해 SDS-PAGE와 웨스턴 블랏을 실시하였다.
- [0197] 예상 분자량은 페리틴 단독이 19kDa, His-tag이 달린 페리틴이 21kDa, 그리고 R5-페리틴이 23kDa이며 전기영동 결과를 통해 분자량 래더를 이용한 결과 페리틴 단독이 18.8kDa, His-페리틴이 21.7kDa, R5-페리틴이 24.7kDa으로 계산되어 예상값과 거의 일치하는 것으로 확인되었다(도 12). His-tag 유무에 관계없이 페리틴 단백질은 가용화 상태로 고발현되었다. R5-페리틴은 가용화 상태와 불용성의 봉입체(inclusion body) 상태의 두 가지 상태로 발현되었고 비율로는 불용성 발현율이 더 높게 나타났다(미도시됨). 가용성 페리틴의 양만을 비교해 볼 때 R5-페리틴은 다른 가용성 페리틴에 비해 약 5배 정도 낮게 발현되었고 His-tag 이 있는 페리틴과 없는 페리틴은 둘 다 비슷하게 발현 되었다(도 12). His-tag이 제거된 페리틴은 항-His tag 항체에 대해 반응하지 않아 웨스턴 블랏에서 검출되지 않았고 His-tag이 달린 페리틴과 R5-페리틴만 검출되었다.
- [0198] <실시예 5> 발현된 페리틴들의 실리카 합성 활성
- [0199] cobalt affinity column을 이용하여 부분 정제된 페리틴 용출액은 Amicon Ultra-0.5mL filter를 이용하여 농축하였다. 세포 파쇄액은 농축하지 않고 바로 활성 확인을 위해 사용하였다. 페리틴 구조체에 달린 펩타이드 자체의 활성을 함께 비교하기 위해 펩타이드를 펩트론 사 (Pepton co. Daejeon)에 의뢰하여 His-tag으로 사용된 펩타이드 MGSSHHHHHSQDP(HT: 서열번호 9)와 His-tag이 연결된 R5 펩타이드 MGSSHHHHHSQDPSSKSGSYSGSKGSKRRIL(HTR5: 서열번호 10)를 합성하였다. 각 펩타이드와 페리틴과 융합된 상태에서의 실리카 합성 활성을 도 13에 나타내었다.
- [0200] 도 13a에 나타난 바와 같이, HT 펩타이드는 단독으로 사용시 실리카 합성 활성이 매우 낮게 나타났으나 페리틴과 융합시 페리틴 침전 속도가 증가하였다. HTR5는 펩타이드 형태일 때에 빠르게 실리카를 침전시켰고 페리틴과 융합 시에는 그 속도가 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과는 융합하는 펩타이드에 따라 실리카 침전 속도 및 코팅 패턴에 차이가 있을 것으로 보인다.
- [0201] 또한, 단백질을 부분 정제하여 반응시킨 경우 도 13b에서 보는 것과 같이 HTR5-Pfr의 실리카 합성 활성이 HT-

Pfr 과 비슷하게 증가하였다. HTR5-Pfr의 합성 반응에 있어 순도가 중요한 것으로 보여진다. 페리틴 단백질과 융합한 펩타이드의 길이에 따라 페리틴의 가용성 발현 가능성이 감소될 수 있으므로 페리틴의 가용성 발현도 가 능하면서 실리카 합성력도 우수한 적당한 길이의 펩타이드 선정이 중요할 것으로 사료된다.

[0202] <실시예 6> 신규 펩타이드-페리틴 융합 단백질의 제조

[0203] 또 다른 융합체 실시예로는 12nm의 자가 조립 구형체를 이루는 페리틴 단백질인 *H. pylori* 유래 페리틴 단백질 과의 실리카 형성 펩타이드들의 융합을 실시하였다. 대표로 EctP2를 사용하여 실시예 4와 유사한 방법으로 페리 틴과의 융합을 실시하였고, 이를 위한 발현 벡터의 모식도는 도 14A에 나타내었고 페리틴과 융합된 실리카 형성 펩타이드 단백질에 의한 자가 캡슐화에 의해 형성된 실리카 응집체의 광학현미경 사진도는 도 14B에 나타내었다.

[0204] 도 14에 나타난 바와 같이, 융합 단백질은 구형의 실리카 구조체를 형성하였다.

[0205] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

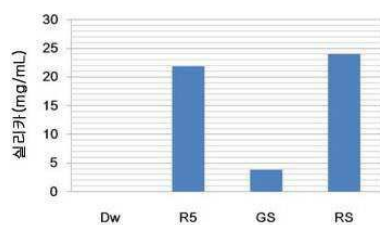
[0206] 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

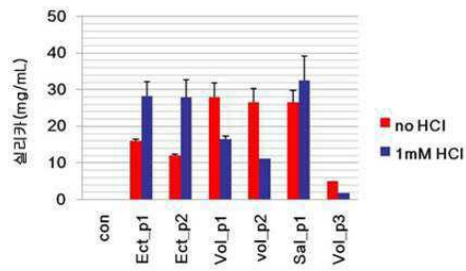
도면1



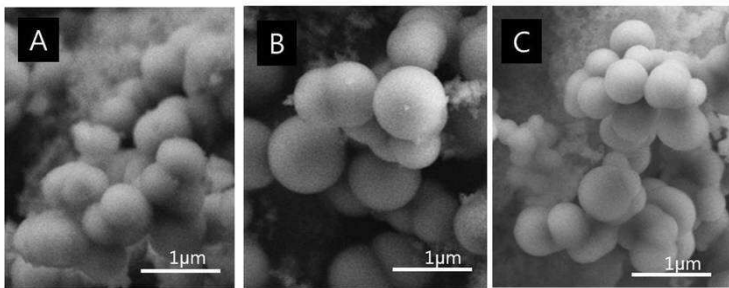
도면2



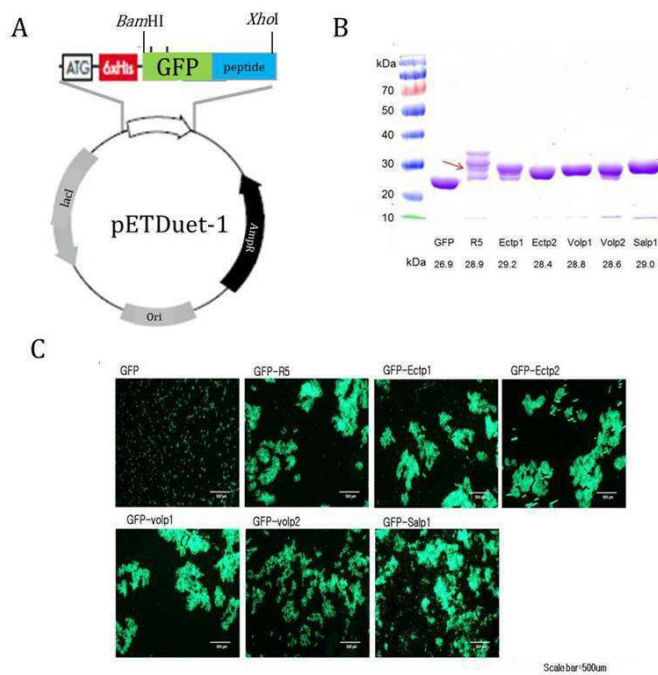
도면3



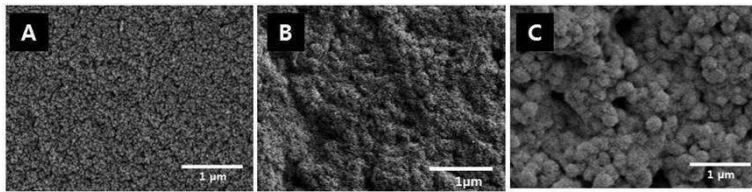
도면4



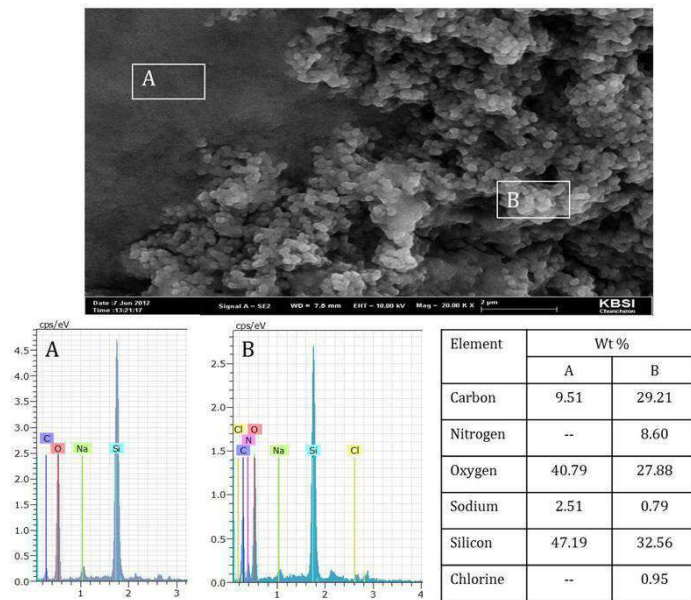
도면5



도면6



도면7



도면8

```

M L S K D I I K L L N E Q V N K E M N S   20
ATGTTATCAAAGACATCATTAAAGTTGCTAAACGAACAAGTGAATAAGGAAATGAACTCT   60

S N L Y M S M S S W C Y T H S L D G A G   40
TCCAACCTGTATATGAGCATGAGTTCATGGTGTCTATACCCATAGCTTAGATGGCGCGGGG   120

L F L F D H A A E E Y E H A K K L I I F   60
CTTTCTTGTGTTGACCATGCGGCTGAAGAATACGAGCATGCTAAAAAGCTTATTATCTTC   180

L N E N N V P V Q L T S I S A P E H K F   80
TTGAATGAAAACAATGTGCCTGTGCAATTGACTAGCATCAGCGCGCCTGAGCATAAGTTT   240

E G L T Q I F Q K A Y E H E Q H I S E S   100
GAAGGTTTGACTCAAATTTTCCAAAAAGCCTATGAACATGAGCAACACATCAGCGAGTCT   300

I N N I V D H A I K S K D H A T F N F L   120
ATTAACAATATCGTCATCAGCCATAAAAAAGCAAAGATCATGCGACTTTCAATTTCTTG   360

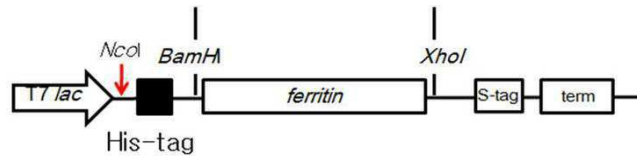
Q W Y V A E Q H E E E V L F K D I L D K   140
CAATGGTATGTGGTGAACAGCATGAAGAAGAAGTGCTTTTCAAGGATATTTTGGATAAA   420

I E L I G N E N H G L Y L A D Q Y V K G   160
ATTGAGTTGATTGGTAATGAAAACCATGGCTTGATTAGCCGATCAGTATGTCAAAGGG   480

I A K S R K S *   167
ATCGCTAAAAGCAGGAAATCTTAA   504

```

도면9



```

MGSSHHHHHSQDPMLSKDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSMSSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKK
LVFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIFQKAYEHQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEE
VLFKDILDKIELIGNE NHGLYLADQYVKGIAKSRKS

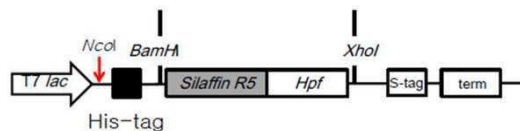
```

도면10

```

>sp|Q9SE35|201-219 (R5)
S S K K S G S Y S G S K G S K R R I L
AGCAGCAAAAAAGCGGCAGCTATAGCGGCAGCAAAGGCAGCAAACGCCGATTCTG

```

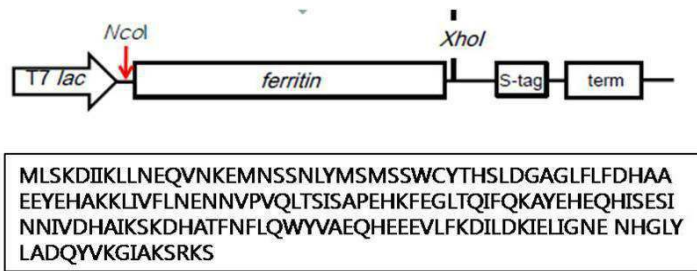


```

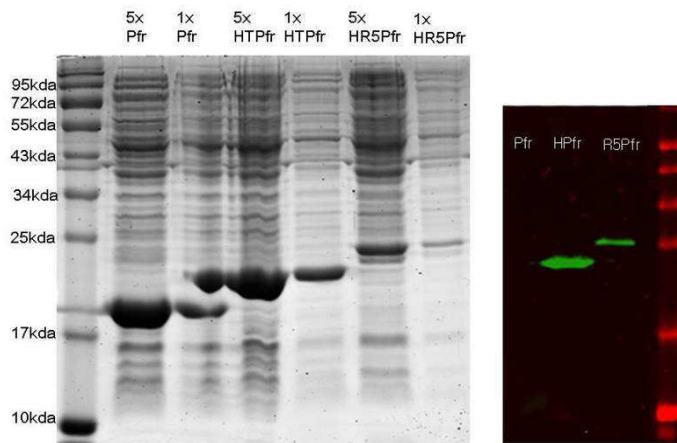
MGSSHHHHHSQDPSSKKSGSYSGSKGSKRRILLSKDIKLLNEQVNKEMNSSNLYMSM
SSWCYTHSLDGAGLFLFDHAAEEYEHAKKLIVFLNENNVPVQLTSISAPEHKFEGLTQIF
QKAYEHQHISESINNIVDHAIKSKDHATFNFLQWYVAEQHEEEVLFKDILDKIELIGNE
NHGLYLADQYVKGIAKSRKS*

```

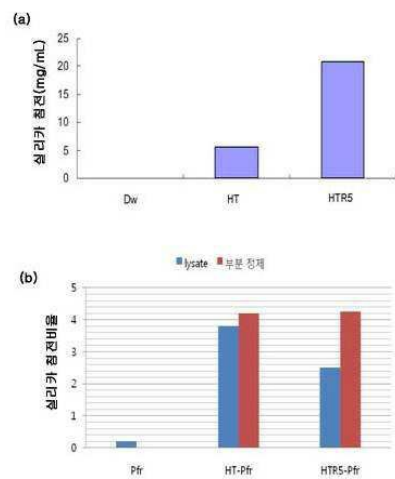
도면11



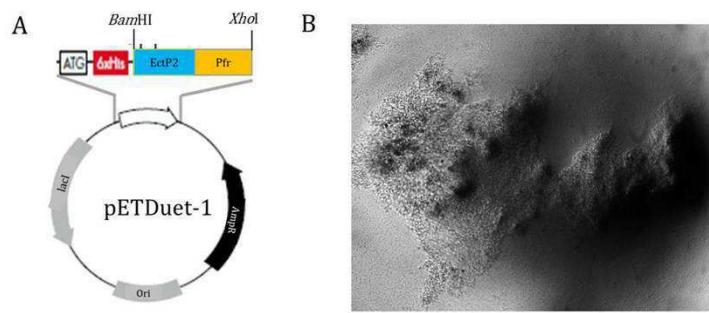
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Peptides capable of silica deposition from marine source and use thereof
- <130> P120954
- <150> KR 2011-0100176
- <151> 2011-09-30
- <150> KR 2011-0100177
- <151> 2011-09-30
- <160> 18
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 26
- <212> PRT
- <213> CAMK/TSSK protein kinase from Salpingoeca sp.
- <400> 1

Arg Arg Arg Arg Arg Gly Cys Gly Arg Arg Arg Gly Gly Arg Gly Gly

1 5 10 15

Arg Gly Arg Gly Gly Cys Gly Arg Arg Arg

20 25

- <210> 2
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> CAMK/TSSK protein kinase from Salpingoeca sp.
- <400> 2

Cys Gly Arg Arg Arg Gly Gly Arg Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Cys

1 5 10 15

Gly Arg Arg Arg

20

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> hypothetical protein Esi_0050_0074 from Ectocarpus siliculosus

<400> 3

Ser Ser Arg Ser Ser Ser His Arg Arg His Asp His His Asp His Arg

1 5 10 15

Arg Gly Ser

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> hypothetical protein Esi_0050_0074 from Ectocarpus siliculosus

<400> 4

Ser Ser Lys Lys Ser Gly Glu Arg His His Arg Ser Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> hypothetical protein VOLCADRAFT_33984 from Volvox carteri f. nagariensis

<400> 5

Ser Gly Arg Arg Arg Gly Ser Arg Arg Arg Gly Ser Arg Arg Arg

1 5 10 15

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> hypothetical protein VOLCADRAFT_95499 from Volvox carteri f. nagariensis

<400> 6

Ser Arg Leu Arg Gly Arg Arg Arg Leu Ser Pro Gly Arg

1 5 10
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> hypothetical protein VOLCADRAFT_95499 from Volvox carteri f. nagariensis
 <400> 7
 Ser Ser His Arg His His His Asp His His Asp His His His

1 5 10
 <210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Silaffin R5 from Cylindrotheca fusiformis
 <400> 8
 Ser Ser Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Lys Arg

1 5 10 15
 Arg Ile Leu

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> His-tag peptide
 <400> 9

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Gln Asp Pro

1 5 10
 <210> 10
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> His-tag peptide linked to silaffin R5 from Cylindrotheca
 fusiformis
 <400> 10

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Gln Asp Pro Ser Ser

1 5 10 15
Lys Lys Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ser Lys Gly Ser Lys Arg Arg Ile
20 25 30
Leu

<210> 11
<211> 504
<212> DNA
<213> Helicobacter pylori 26695 pfr gene

<400> 11
atgttatcaa aagacatcat taagttgcta aacgaacaag tgaataagga aatgaactct 60
tccaacttgt atatgagcat gagttcttgg tgctataccc atagcttaga tggctcgggg 120
cttttcttgt ttgacatgc ggctgaagaa tacgagcatg ctaaaaagct tatcgitttc 180
ttgaatgaaa acaatgtgcc tgtgcaattg accagcatca gcgcgcctga gcataagttt 240
gaaagcttga ctcaaatttt ccaaaaagcc tatgaacatg agcaacacat cagcgagtct 300
attaataata tcgtcgatca cgccataaaa agcaaagatc atgcgacttt caatttcttg 360
caatggtatg tggctgaaca gcatgaagaa gaagtgcitt tcaaggatat ttggataaa 420

attgagttga ttggtaatca aaaccatggc ttgtatttgg ctgatcagta tgtcaaaggg 480
atcgctaaaa gcaggaaatc ttaa 504

<210> 12
<211> 167
<212> PRT
<213> Helicobacter pylori 26695 pfr
<400> 12

Met Leu Ser Lys Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asn Glu Gln Val Asn Lys
1 5 10 15
Glu Met Asn Ser Ser Asn Leu Tyr Met Ser Met Ser Ser Trp Cys Tyr
20 25 30
Thr His Ser Leu Asp Gly Ser Gly Leu Phe Leu Phe Asp His Ala Ala

35 40 45
Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Leu Ile Val Phe Leu Asn Glu Asn
50 55 60

Asn Val Pro Val Gln Leu Thr Ser Ile Ser Ala Pro Glu His Lys Phe
 65 70 75 80
 Glu Ser Leu Thr Gln Ile Phe Gln Lys Ala Tyr Glu His Glu Gln His
 85 90 95
 Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn Ile Val Asp His Ala Ile Lys Ser Lys
 100 105 110

Asp His Ala Thr Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala Glu Gln His
 115 120 125
 Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile Glu Leu Ile
 130 135 140
 Gly Asn Gln Asn His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr Val Lys Gly
 145 150 155 160
 Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser
 165

<210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GS peptide

<400> 13
 Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Asn Asn Lys
 1 5 10

<210> 14
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PF primer

<400> 14
 cgggatccga tggtatcaaa agacatcatt aagttgcta

39

<210> 15
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PR primer
 <400> 15
 ccgctcgagt cattaagatt tctgctttt agcgatc 37

<210> 16
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SPF primer
 <400> 16
 cagcaaaggc agcaaagcc gcattctgtt atcaaaagac atcattaagt tgcta 55

<210> 17
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SF primer
 <400> 17
 cgggatccga gcagcaaaaa aagcggcagc tatagcggca gcaaaggcag caaacgccgc 60
 attctg 66

<210> 18
 <211> 43
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> BsaI_PF primer
 <400> 18
 gccctctcg gtctcccatg ttatcaaaag acatcattaa gtt 43